



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

225134

(11) (52)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 37/26

(22) Přihlášeno 11 08 69
(21) (PV 849-78)

(40) Zveřejněno 31 12 82

(45) Vydáno 15 02 86

(72) Autor vynálezu JØRGENSEN KLAUS HOLGER, VIRUM (Dánsko)

(73) Majitel patentu NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM, KODAN (Dánsko)

(54) Způsob čištění komerčního nebo surového inzulínu

Aplikuje-li se vodný roztok komerčního nebo surového inzulínu o pH 6 až 10 na sloupec aniontoměníče a poté se sloupec eluuje ve frakcích s vodou mísitelným alifatickým C₁-C₃-alkanolem a jímají-li se frakce vykazující esenciálně jedinou složku (při analýze pomocí DISC PAGE), získá se inzulín prostý pankreatických bílkovin o molekulové hmotnosti vyšší, než je molekulová hmotnost inzulínu, a prostý antigenních nečistot podobných inzulínu o přibližně téže molekulové hmotnosti jakou má inzulín. Uvedený s vodou mísitelný alkanol obsahuje v množství 20 až 70 % objemových a má pH 6 až 10.

Vynález se týká způsobu čištění komerčního nebo surového inzulínu pro jeho zbavení pankreatických bílkovin o molekulové hmotnosti vyšší než je molekulová hmotnost inzulínu, totiž nad 6 000, i antigenních inzulínu podobných nečistot o přibližně téže molekulové hmotnosti jako má inzulín, aplikací k čištění určeného inzulínu na sloupce měniče aniontů.

Britský patentní spis č. 1 285 023 popisuje injekční inzulínový přípravek s obsahem inzulínu získaného ze slinivky břišní, rozpuštěného nebo suspendovaného ve vodném injekčním médiu, přičemž inzulín je prost bílkovin pankreatického původu o molekulové hmotnosti nad 6 000 a vykazuje v podstatě jedinou složku při analýze jeho roztoku polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (tzv. metoda Disc Page).

Jako výchozího materiálu při čištění inzulínu se obvykle používá komerčního inzulínu, tj. amorfního inzulínu nebo krystalického inzulínu, který může být několikrát překrystalován. Lze však rovněž používat surového inzulínu, například koláče, solí, obsahujícího inzulín, jenž vzniká při izolaci inzulínu z pankreatických žláz a obvykle obsahuje 10 až 31 % hmotnostních inzulínu, avšak pro vysoký obsah nečistot je tento materiál méně vhodný pro způsob čištění podle vynálezu. Lepší výchozí materiál lze získat zpracováním roztoku koláče solí isoelektrickým sražením nastavením hodnoty pH roztoku na 5,5 a izolací sraženiny odstředěním.

Původně panoval obecný názor, že vhodně překrystalovaný inzulín ve formě romboedru s ostrými hranami, spojených s rovnými krystalovými plochami, představuje čistou bílkovinu, inzulín, jehož konfigurace byla určena Sangerem se sp., viz například *Biochemical Journal* 60 (1955), 556. Později však bylo nalezeno, že tomu tak není. Vědecká analytická zkoumání ukázala, že zmíněný krystalický inzulín obsahuje bílkoviny pankreatického původu s molekulární hmotností vyšší než má čistý inzulín a kromě toho látky podobné inzulínu přibližně stejné molekulové hmotnosti jakou má čistý inzulín (asi 6 000).

Bylo dokázáno, že krystalický inzulín rozpuštěný v 1 M kyselině octové lze frakcionovat ve složky (a), (b) a popřípadě (c), gelovou filtrací na koloně Sephadexu G-50 ("Sephadex" je chráněná známka), což je dextran zesíťovaný epichlorhydrinem s limitem penetrace asi 10 000 (minimální molekulová hmotnost vylučované látky), který je ve formě zrn (průměr 20 až 80 mikronů). Tyto tři složky lze izolovat obvyklými způsoby z jejich roztoků, například vysolením, sražením zinečnatou solí při neutrální reakci, lyofilizací apod. Obě složky (a) a (b) obsahují bílkoviny pankreatického původu s molekulární hmotností vyšší než 6 000, zatímco složka (c) obsahuje čistý inzulín kontaminovaný bílkovinami podobnými inzulínu, přibližně stejné molekulární hmotnosti jakou má čistý inzulín.

Množství složky (a) může tvořit 2 až 5 % hmotnostních krystalovaného inzulínu a méně než 1 % hmotnostních překrystalovaného inzulínu. Množství složky (b) může činit v obou případech 4 až 8 % hmotnostních a množství bílkovin podobných inzulínu ve složce (c) může činit 5 až 13 % hmotnostních ve složce (c).

Imunologické pokusy provedené na zvířatech, které tvořily základ tohoto vynálezu prokázaly, že výše uvedené složky (a) a (b) a do určité míry bílkoviny podobné inzulínu přítomné ve složce (c) jsou v podstatě odpovědné za antigenní vlastnosti dosud známých inzulínových preparátů.

Účelem vynálezu je odstranit jednoduchým a účinným způsobem nečistoty obsažené nejenom v surovém inzulínu, ale zejména v komerčním inzulínu tak, že čištěný inzulín nevykazuje žádnou nebo podstatně sníženou antigenicitu, protože neobsahuje ani vysokomolekulární bílkoviny a ani antigenní látky podobné inzulínu.

Podstata vynálezu způsobu čištění komerčního nebo surového inzulínu pro jeho zbavení pankreatických bílkovin o molekulové hmotnosti nad 6 000 a podobných nečistot pomocí sloupcové chromatografie spočívá v tom, že jako vodného roztoku inzulínu, který má být čištěn,

se používá roztoku o hodnotě pH v rozsahu 6 až 10, ze sloupce se frakce vymývají alifatickým alkanolem (o 1 až 3 uhlíkových atomech v molekule) mísitelným s vodou, který obsahuje v množství 20 až 70 % objemových, výhodně 30 až 50 % objemových a který má hodnotu pH v rozsahu 6 až 10, výhodně 6,5 až 8,5, jímá se nebo jímají se frakce eluátu vykazující při analýze pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (DISC PAGE) esenciálně jedinou složku, a inzulin takto vyčištěný se izoluje ze zjištěné frakce nebo ze zjištěných frakcí. Je výhodné jako měniče aniontů používat silně bazického měniče aniontů

Pro analytické účely byla již použita diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, rovněž v souvislosti s krystalickým inzulinem. Tato specifická gelová elektroforéza byla vyvinuta B. J. Davise a L. Ornsteinem a je popsána v *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141, str. 321 až 349 a 404 až 427 (1964). V tomto případě se ve spodním gelu používá 7,5% polyakrylamidu, který obsahuje 8 M močovinu a má hodnotu pH asi 8,7, zatímco vrchní gel a namášený roztok inzulinu, obsahující asi 0,1 mg inzulinu, obsahují rovněž 8 M močovinu.

Je nejenom překvapující, že podle vynálezu lze odstraňovat vysokomolekulární bílkoviny, je však rovněž překvapující, že diskontinuální elektroforézy na polyakrylamidovém gelu lze používat jako kritéria nepřítomnosti těchto bílkovin, neboť je známo, že použití tohoto analytického způsobu v souvislosti s komerčním inzulinem poskytuje inzulinový pás obsahující vysokomolekulární bílkovinu, dimer, viz například článek Steinera a spol. v *Diabetes*, 17, str. 728, sloupec vpravo.

Dále nemohlo být očekáváno, že použité eluční činidlo by mohlo být schopné vytvářet takový monomerizační efekt u přítomných bílkovin, aby byla možná separace látek podobných inzulinu.

Měníče aniontů, které by měly být s výhodou silně bazického typu, používané při způsobu podle vynálezu, jsou známy. Příklady slabě bazických měničů aniontů jsou Bio-Gel IM, vyráběný na bázi polyakrylamidů, DEAE-Sephadex, vyráběný ze síťovaných dextransů a DEAE-celulóza, vyráběná z celulózy. Příklady silně bazických měničů aniontů jsou Dowery ("Dowex" je chráněná známka), vyráběné z polystyrénů a QAE-Sephadex, vyráběný ze zesíťovaných dextransů.

Příklady vodou obsahujících a vodou mísitelných organických elučních rozpouštědel jsou tetrametylmočovina, dimetylformamid, dioxan, a vodou mísitelné ketony, například aceton, a alkanoly, například metanol, etanol a propanoly. Alkanoly představují výhodná organická eluční rozpouštědla pro použití při způsobu podle vynálezu a používají se s výhodou ve formě, která obsahuje od 30 do 50 % objemových vody.

Eluční činidlo obsahuje vždy pufrací látku pro kontrolu hodnoty pH elučního činidla. Je výhodné provádět způsob podle vynálezu při stále hodnotě pH. Hodnota pH elučního činidla by měla být udržována v rozmezí od 6,5 do 8,5, měřeno skleněnou elektrodou, nastavenou obvyklým způsobem na standardní pufr.

Vhodné pufrы lze nalézt v dostupné literatuře.

Zásadní význam má konstantní teplota během výměny iontů. Teplotu lze volit v rozmezí od -10 °C do 40 °C, s výhodou od 0 °C až do 30 °C. Čištěný inzulin a jímavých frakcí lze izolovat obvyklým způsobem, například odpařením, vysolením nebo srážením v amorfni nebo krystalické formě v přítomnosti iontů zinku.

Při izolaci inzulinu je známo podrobit kyselé nebo neutralizované alkoholické extrakty z pankreatu sloupcové chromatografii na měniči kationtů, například na karboxymethylcelulóze (francouzský patentní spis č. 1 499 126), sulfonovaných pryskyřicích syntetizovaných z kopolymeru styrenu a divinylbenzenu (britský patentní spis č. 1 054 523) nebo na měniči aniontů, například na diethylaminoethylcelulóze (britský patentní spis č. 931 954). Avšak

inzulín získaný těmito způsoby obsahuje nečistoty stejně jako krystalický inzulín získaný obvyklými izolačními způsoby včetně opakovaného srážení surových roztoků inzulinu vysolováním chloridem sodným.

Z britského patentního spisu č. 881 855 je rovněž známá sloupcová chromatografie nespecifikovaného zink-inzulínu na měniči kationtů "Dowex 50-XI" (sulfonovaný styren-divynyl-ový kopolymer v zrněné formě) za použití vodného etanolu jako elučního činidla, avšak i když se jako výchozího materiálu použije překrystalovaného inzulinu, izolovaný inzulín obsahuje většinou tytéž nečistoty jako výchozí materiál, protože se jímají všechny frakce obsahující inzulín a nikoliv specifické frakce obsahující inzulín, které vykazují jedinou složku pomocí metody DISC PAGE.

Z britského patentního spisu č. 913 042 je dále známo čištění krystalického inzulinu ve směsi s amorfními nebo cizími mikrokrytalickými materiály promýváním nečistého krystalizátu vodným roztokem, jehož hodnota pH je udržována od 3,8 do 4,3 pomocí slabé kyseliny nebo směsi pufrů. Tento stupeň čištění však neodstraňuje takové nečistoty jako proinzulín, dimer nebo jeho intermediát.

Konečně z britského patentového spisu č. 871 541 je známá sloupcová chromatografie šestkrát krystalovaného inzulinu a inzulinu čištěného jak je popsáno Lensem [Biochem. et Biophys. Acta (1948) 2, 76] na styren-divynylbenzenovém kopolymerovém měniči kationtů na netečném zředovadle s velkým povrchem, avšak inzulín obsahuje po této chromatografii ještě nečistoty, například proinzulín, dimer a intermediát spolu s arginin-inzulínem a monodesaminoinzulínem, protože přítomnost těchto nečistot nezabraňuje tomu, aby chromatogram nevzbuzoval dojem, že materiál eluovaný z kolony je v podstatě homogenní.

Vynález je ilustrován následujícími příklady.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Připraví se pufr tohoto složení:

0,1 M roztok chloridu amonného

0,02 M roztok amoniaku

60% etanol (obj./obj.)

Hodnota pH je 8,3 při 25 °C.

15 g měniče aniontů Dowex 1 x 2 (oka: 50/100) se nechá nabobtnat v pufru a nejjemnější částice se odstraní dekantací. Materiálu se použije k naplnění kolony o průměru 1,6 cm a výšce 25 cm. Kolona se ekvilibruje pufrům. Dowex 1 x 2 je kopolymer styrenu s 2 % divinylbenzenem, jenž obsahuje jako funkční skupiny benzytrimetylamoniové skupiny a je v zrněné formě.

500 mg inzulinu, jednou krystalovaného z citrátového pufru, se rozpustí ve směsi 20 mg dvojsodné soli kyseliny etylendiamintetraoctové, 5 ml pufru, 5 ml 60% (obj./obj.) etanolu a 0,04 ml 15,3 M roztoku amoniaku (konečná hodnota pH 8,5). Nerozpustný materiál se odstraní odstředěním a čirý roztok se nanese na kolonu. Vymývání se provádí pufrům při teplotě 25 °C a rychlostí 7,5 ml/h. Jímají se frakce po 5 ml.

Měří se hodnoty extinkce při 276 nm a vynášejí se proti číslům frakcí. Frakce odpovídající střední hlavní části inzulinového maxima (největší maximum), která elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (tzv. DISC PAGE) vykazovala esenciálně jedinou komponentu, se smísí a inzulín se sráží přidáním 100 ml vody, 1,3 ml 1 N roztoku kyseliny chlorovodíkové a 2 ml

1 N roztoku octanu zinečnatého na 100 ml spojených frakcí. Sraženina se izoluje odstředěním a krystaluje známým způsobem ze směsi aceton-citrátový pufr. Výtěžek čištěného inzulínu je 200 mg.

P ř í k l a d 2

Připraví se pufr tohoto složení:

25,0 g tris(hydroxymetyl)aminometanu
29,0 ml 6 N roztok kyseliny chlorovodíkové
1,2 litru metanolu

Voda k doplnění celkového objemu na 2 litry. Hodnota pH je 7,3 při 25 °C.

40 g měniče aniontů QAE-Sephadex A-25 se nechá nabobtnat v pufru a nejjemnější částice se odstraní dekantací. Materiálu se použije k naplnění kolony o průměru 2,5 cm a výšce 25 cm. Kolona se ekvilibruje puftrem. QAE-Sephadex A-25 je dextran zesítěný epichlorhydrinem s limitem penetrace asi 5 000 (minimální molekulová hmotnost vyloučených látek), jenž má jako funkční skupiny dietyl-(2-hydroxypropyl)-aminoethylskupiny, je v zrněné formě (průměr 40 až 120 mikromů).

500 mg inzulínu krystalovaného jednou z citrátového pufru se rozpustí ve směsi 25 mg dvojsodné soli kyseliny etyléndiamintetraoctové, 94 mg tris(hydroxymetyl)aminometanu, 10 ml 60% metanolu (obj./obj.) a 0,073 ml 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové (konečná hodnota pH 7,3). Nerozpustný materiál se odstraní odstředěním a čirý roztok se nanese na kolonu. Vymývání se provádí puftrem při teplotě 25 °C a rychlostí 30 ml/h. Jímají se frakce po 5 ml. Extinkce se měří při 276 nm a vynáší proti číslům frakcí. Frakce odpovídající střední hlavní části inzulínového maxima (největší maximum), která elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (tzv. DISC PAGE) vykazovala esenciálně jedinou komponentu, se smísí a inzulín se sráží přidáním 100 ml vody a 2 ml 1 N roztoku octanu zinečnatého na 100 ml spojených frakcí. Sraženina se izoluje známým způsobem odstředěním a krystaluje ze směsi aceton-citrátový pufr. Výtěžek čištěného inzulínu je 250 mg.

P ř í k l a d 3

Připraví se pufr tohoto složení:

0,06 M tris(hydroxymetyl)aminometanu
0,02 M roztok kyseliny chlorovodíkové
0,075 M roztok chloridu sodného
60 % etanol (obj./obj.)

Hodnota pH je 8,3 při 25 °C.

80 g měniče aniontu uvedeného v příkladu 2 se nechá nabobtnat v pufru a nejjemnější částice se odstraní dekantací. Materiál se použije k naplnění kolony o průměru 2,5 cm a výšce 50 cm. Kolona se ekvilibruje puftrem.

2,5 g inzulínu krystalovaného jednou z citrátového pufru se rozpustí při teplotě 0 °C ve směsi 450 mg tris(hydroxymetyl)aminometanu, 100 mg čtyřsodné soli kyseliny etyléndiamintetraoctové, 25 ml pufru, 25 ml 60% etanolu (obj./obj.) a 0,08 ml 4 N roztoku kyseliny chlorovodíkové (konečná hodnota pH při 25 °C je 8,4). Nerozpustný materiál se odstraní odstředěním při teplotě 2 až 4 °C a čirý filtrát se nanese na kolonu. Vymývání se provádí puftrem při teplotě 4 °C a rychlostí 26 ml/h. Jímají se frakce po 20 ml.

Extinkce se měří při 276 nm a vynáší proti číslům frakcí. Frakce odpovídající střední hlavní části inzulinového maxima (největší maximum), která elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (tzv. DISC PAGE) vykazala esenciálně jedinou komponentu, se smísí a inzulin se sráží přidáním stejného objemu 0,02 M roztoku octanu zinečnatého, 0,03 N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Sraženina se izoluje odstředěním a krystaluje ze směsi acetoncitratový pufr známým způsobem.

Výtěžek čištěného inzulinu je 1,3 g.

Příklad 4

Připraví se pufr následujícího složení:

14,9 g hydrochloridu histidinu
38,7 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného
16,1 g chloridu sodného
3,12 litrů 96% etanolu (obj./obj.)

Voda k doplnění celkového objemu 5 litrů. Hodnota pH při teplotě 25 °C je 6,5.

35 g měniče aniontů uvedeného v příkladu 2 se nechá nabobtnat v pufru a nejjemnější částice se odstraní dekantací. Materiál se použije k naplnění kolony průměru 2,5 cm a výšky 25 cm. Kolona se ekvilibruje puftrem.

500 mg inzulinu jednou krystalovaného z citrátového pufru se rozpustí ve směsi 20 mg dvojsodné soli kyseliny etyléndiamintetraoctové, 6,5 ml pufru a 6 ml 60% etanolu (obj. na objem), přičemž hodnota pH se nastaví na 6,8 přidáním 1 N roztoku hydroxidu sodného. Nerozpustný materiál se odstraní odstředěním a čirý roztok se nanese na kolonu. Vymývání se provádí puftrem při teplotě 27 °C a rychlosti 30 ml/h. Jímají se frakce po 5 ml.

Extinkce se měří při 276 nm a vynáší proti číslům frakcí. Frakce odpovídající střední hlavní části inzulinového maxima (největší maximum), která elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (tzv. DISC PAGE) vykazala esenciálně jedinou komponentu, se smísí a inzulin se sráží přidáním stejného objemu 0,02 M roztoku octanu zinečnatého. Sraženina se izoluje odstředěním a krystaluje ze směsi aceton-citratový pufr známým způsobem. Výtěžek čištěného inzulinu je 210 mg.

Příklad 5

Připraví se pufr tohoto složení:

1,25 kg tris(hydroxymetyl)aminometanu
725 ml 12,3 N roztoku kyseliny chlorovodíkové
62,4 litrů 96% etanolu (obj./obj.)

Voda k doplnění celkového objemu na 100 litrů. Hodnota pH při teplotě 25 °C je 7,3.

1,3 kg měniče aniontů uvedeného v příkladu 2 se nechá nabobtnat v pufru a nejjemnější částice se odstraní dekantací. Materiál se použije k naplnění kolony průměru 15 cm a výšky 25 cm. Kolona se ekvilibruje puftrem.

18 g překrystalovaného vepřového nebo hovězího inzulinu, obsahujícího 0,4 % zinku, se rozpustí ve směsi 0,72 g dvojsodné soli kyseliny etyléndiamintetraoctové, 10,2 g tris(hydroxymetyl)aminometanu a 720 ml 60% etanolu (obj./obj.). Nerozpustný materiál se odstraní odstředěním. K čirému roztoku se přidá 10,7 ml 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové

a roztok se nanese na kolonu, Vymývání se provádí pufrům při teplotě 25 °C a rychlostí 1,2 litr/h. Jímají se frakce po 0,5 litru.

Extinkce se měří při 276 nm (E_{276}) a vynáší se proti číslům frakcí. Frakce odpovídající střední hlavní části inzulínového maxima (největší maximum), která elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (tzv. DISC PAGE) vykazovala esenciálně jedinou komponentu, se spojí. Inzulín se sráží ze spojených frakcí přidáním stejného objemu 0,02 M roztoku octanu zinečnatého. Sraženina se izoluje odstředěním a krystaluje ze směsi aceton-citrátový pufr známým způsobem.

Získá se 8,2 g čistěného inzulínu. Inzulín se překrystaluje z pufru následujícího složení:

2,0	inzulínu
0,8 % Zn^{++}	(ve formě chloridu) vztaženo na hmotnost inzulínu
0,1 M	roztok octanu sodného
7,0 %	chloridu sodného

Kyselina chlorovodíková do hodnoty pH 5,45 až 5,55.

Inzulín se rozpustí ve vodě obsahující kyselinu chlorovodíkovou a chlorid zinečnatý, načež se přidá roztok obsahující příslušné množství octanu sodného a chloridu sodného. Krystalizace se provádí za mechanického míchání při teplotě místnosti. Krystalizace je skončena během jednoho nebo dvou dnů. Inzulín se izoluje filtrací, promyje vodou a suší ve vakuu. Výtěžek je 8,0 g.

Čistěného inzulínu lze používat pro přípravu všech druhů farmaceutických inzulínových přípravků pro klinické použití.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob čištění komerčního nebo surového inzulínu pro jeho zbavení pankreatických bílkovin o molekulové hmotnosti vyšší než je molekulová hmotnost inzulínu, totiž nad 6 000, i antigenních inzulínu podobných nečistot o přibližně téže molekulové hmotnosti jako má inzulín, aplikací k čištění určeného inzulínu na sloupec měniče aniontů vyznačující se tím, že jako vodného roztoku inzulínu, který má být čištěn, se používá roztoku o hodnotě pH v rozsahu 6 až 10, ze sloupce se frakce vymývají alifatickým C_1 - C_3 -alkanolem mísitelným s vodou, který obsahuje vodu v množství 20 až 70 % obj. a který má hodnotu pH v rozsahu 6 až 10, jímá se nebo jímají se frakce eluátu vykazující při analýze pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (DISC PAGE) esenciálně jedinou složku, a inzulín takto vyčištěný se izoluje ze zjištěné frakce nebo ze zjištěných frakcí.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako eluentu používá s vodou mísitelného C_1 - C_3 -alkanolu obsahujícího 30 až 50 % objemových vody.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se používá eluentu o hodnotě pH 6,5 až 8,5.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako měniče aniontů se používá silně bázičského měniče aniontů.